R. Istituto di Studi Superiori in Firenze.
(Laboratorio di Patologia generale diretto dal **Prof. A. Lustig**).

CONTRIBUTO

ALLO

STUDIO DELLA FISIOLOGIA DELLA CELLULA

(PARTECIPAZIONE DEL NUCLEO ALLA FUNZIONE DI SECREZIONE)

RICERCHE CITOLOGICHE

DEL

DOTT. ARNALDO TRAMBUSTI

Aiuto e libero docente di Patologia generale.

R. Istituto di Studi Superiori in Firenze.
(Laboratorio di Patologia generale diretto dal **Prof. A. Lustig**).

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLA FISIOLOGIA DELLA CELLULA

(PARTECIPAZIONE DEL NUCLEO ALLA FUNZIONE DI SECREZIONE)

RICERCHE CITOLOGICHE

DEL

DOTT. ARNALDO TRAMBUSTI

Aiuto e libero docente di Patologia generale.

Non è il caso di rifare in questa brevissima nota la storia della fisiologia cellulare.

Le moderne ricerche citologiche hanno avuto per scopo l'analisi minuta dell'organismo primordiale e hanno contribuito ad allargare il significato fisiologico dei suoi vari costituenti.

Così il nucleo nel quale per l'addietro si faceva risiedere esclusivamente la funzione della riproduzione acquista oggi, per quegli studi, una maggiore importanza funzionale.

Le osservazioni numerose di Haberland, di Korschelt, di Heidenhain, di Hertwig, di Nussbaum, di Verworn, e di molti altri dimostrano che fra nucleo e citoplasma esistono rapporti funzionali molto più numerosi di quelli che regolano la funzione di riproduzione.

Il nucleo viene considerato come la sede di una influenza dinamica (Haberlandt 4), come un centro automatico, coordinatore (Hertwig 6, Hofer 7) e psichico (Eimer 3) da cui verrebbe regolata l'attività della cellula.

Verworn (11) crede che il nucleo abbia fra gli altri uffici, quello importantissimo di elaborare delle sostanze che servi-

rebbero a neutralizzare l'azione tossica per l'organismo cellulare di alcuni di quei prodotti che derivano dal lavorio biochimico del protoplasma.

Ma quale è il meccanismo col quale si effettuano questi rapporti funzionali fra nucleo e citoplasma?

Questo è il quesito che finora la fisiologia cellulare non ha saputo risolvere.

Le recenti ricerche di Demoor (2) che pure hanno portato un notevole contributo alla fisiologia della cellula, non chiariscono questo punto. Esse però dimostrano che nucleo e protoplasma, le cui attività si completano nel lavoro utile dell'elemento cellulare sono due organizzazioni biologicamente differenti. Basterebbe per dimostrarlo il fatto che il nucleo, a differenza del protoplasma, può vivere per molto tempo e forse anche permanentemente di una vita anarobia.

*
* *

Fra le varie funzioni dell'elemento cellulare, la funzione di secrezione è quella in cui oggi i rapporti fra nucleo e citoplasma vengono più generalmente ammessi.

Veramente questa idea della partecipazione del nucleo alla funzione di secrezione non è nuova. Essa rimonta fino al 1846 ed è dovuta a Meckel (10) che pel primo emise l'ipotesi che le diramazioni dei nuclei cellulari nelle glandule filiere dei bruchi delle farfalle, fossero da interpetrarsi come una speciale attività del nucleo atta a influenzare la funzione della secrezione cellulare.

Il nucleo avrebbe per questo autore una grande importanza. Esso funzionerebbe « da regolatore o da vera sorgente dell'attività cellulare. »

Le osservazioni di Leydig (9), di Carnoy (1), di Helm (5), ma più specialmente quelle di Zaddach (12) e di Korschelt (8) pure su cellule di glandule filiere, hanno confermato l'ipotesi di Meckel.

È interessante l'osservazione di questi ultimi autori di non aver trovato nuclei diramati in quelle larve che si erano già formate il guscio, e che avevano cessato di filare ed è pure importante l'altra osservazione che le diramazioni nucleari sono

più notevoli durante il massimo dell'attività secretiva delle glandule, quando cioè i bruchi abbandonano le foglie per formare il bozzolo.

Cessata la secrezione cellulare, i prolungamenti del nucleo si retraggono; il nucleo riprende a poco a poco la forma rotonda e finisce col raggrinzarsi e morire.

Queste ramificazioni nucleari furono osservate in molte altre cellule secretive da altri autori, e furono considerate come la prova della partecipazione del nucleo alla funzione di secrezione.

Così nelle cellule di una glandula salivare di una larva di *friganea* e nelle cellule glandulari della pelle nella *Chelonia caya* Carnoy (1) ha osservato tutti gli stadi di queste modificazioni morfologiche del nucleo.

Korschelt (8) ha potuto costatare anche a fresco queste ramificazioni nelle glandule salivari del *Chironomus plumosus*, e ha pure riscontrate queste ramificazioni nelle glandule tessili del *Cladius difformis* che pure differiscono moltissimo dalle glandule dei lepidotteri.

A questo stesso autore si deve pure l'osservazione che i nuclei delle cellule epiteliari dei follicoli ovarici del *Carabus memoralis*, nel tempo della formazione della sostanza vitellina e del corion, stanno aderenti alla parete interna della cellula, mentre più tardi, quando l'attività follicolare è finita, ritornano al centro della cellula.

Anche questo fatto dell'avvicinarsi del nucleo alla zona dove la funzione di secrezione è più intensa, verrebbe a confermare l'ipotesi già sopra espressa della sua partecipazione a questa importante funzione cellulare, cosa che apparisce chiara nelle cellule gemelle dell'epitelio follicolare di *Ranatra* e di *Nepa*, studiate da Korschelt stesso e nelle quali è evidente l'emissione dei prolungamenti nucleari solo da quella parte dove vengono elaborati nel protoplasma i prodotti di secrezione.

*
* *

Dopo una lunga serie di osservazioni di cui non ho riportato che le principali e che provano indubitatamente la partecipazione del nucleo nella funzione di secrezione, ci vien fatto

di rivolgerci la stessa domanda che Korschelt pure si fa nella sua bella monografia sulla Morfologia e fisiologia del nucleo cellulare.

Il nucleo cede al protoplasma una qualche sostanza oppure la sua influenza non si esercita che per semplice contatto, quasi uno stimolo sulla sostanza cellulare?

Korschelt non è in grado di dare una risposta soddisfacente a queste domande. Nè Heidenhain, nè i suoi scolari, nè tutti gli altri osservatori che portarono un largo contributo a questi studi di fisiologia cellulare e di cui ho tralasciato per brevità di riportare i risultati delle numerose ricerche, non risolvono in alcun modo la questione.

Così il meccanismo pel quale il nucleo viene a partecipare a una delle più importanti funzioni cellulari è ancora sconosciuto.

*
* *

In un mio lavoro che è in corso di pubblicazione, ho riferito i resultati di alcune mie ricerche fatte nell'anno scorso sulla fisiopatologia della cellula epatica.

In quelle mie ricerche ho potuto dimostrare che il nucleo della cellula epatica prende parte attiva nella funzione di secrezione della cellula stessa e quello che è più interessante, e che per quanto mi consta non era stato dimostrato per l'addietro, *vi prende parte somministrando al citoplasma dei materiali già elaborati nel nucleo stesso.*

Ho anche richiamato l'attenzione sulla importanza che hanno le alterazioni nucleari per spiegare l'alterazione della funzione cellulare in alcune condizioni patologiche dell'organo epatico.

Anche il dott. Galeotti, nel nostro laboratorio, potè in seguito, per altre cellule, confermare questi miei resultati in alcune sue ricerche sulle granulazioni cellulari.

In questa brevissima nota non faccio che portare un nuovo contributo a quei primi risultati, riferendo alcune ricerche fatte sulle glandule del veleno dello *Spelerpes fuscus:* glandule che, con altri metodi e con altri intenti furono pure studiate dal

dott. Galeotti nel lavoro a cui ho accennato e che è pure in corso di pubblicazione.

***

Le glandule del veleno dello *Spelerpes* che si trovano assai numerose su tutta quanta la cute, sono acinose semplici e constano di un certo numero di cellule che variano di forma e di struttura a seconda dell'attività funzionale della glandula stessa.

Ho esaminato queste cellule glandulari nei vari stadi dell'attività fisiologica e ho studiato queste stesse cellule dopo iniezioni endoaddominali di cloridrato di pilocarpina all'1 $^0/_0$, che ha la proprietà di attivare considerevolmente la secrezione cellulare.

I pezzi di cute su cui dovevo praticare i tagli vennero fissati in soluzione satura di sublimato corrosivo.

Le sezioni in serie dei pezzi previamente induriti e inclusi in paraffina, vennero colorate colla miscela di Biondi e con lo stesso metodo di cui mi sono servito nelle ricerche sulla cellula epatica e che ho esposto dettagliatamente in quel mio lavoro, dove ho pure accennato alla ragione per cui, secondo il mio modo di vedere, sia da preferirsi la colorazione colla miscela di Biondi a tutti gli altri metodi di colorazione, tutte le volte che si vogliano studiare le alterazioni dei vari costituenti del nucleo e più specialmente quelle del carioplasma.

***

Quando le glandule del veleno si trovano nel primo stadio dell'attività secretoria: in quello stadio che si chiama da alcuni impropriamente *stadio di riposo*, per la sola ragione che l'elaborazione dei prodotti di secrezione non si manifesta per alcuna modificazione della struttura cellulare, le cellule sono piccole e schiacciate sul fondo dell'acino. Non contengono granulazioni citoplasmatiche o se ne contengono sono scarsissime e assai piccole. La cellula è percorsa da un sottile reticolo protoplasmatico colorato debolmente in roseo (fig. 1).

In queste condizioni il nucleo è ovale con l'asse maggiore parallelo alla porzione basale della parete cellulare. Misura 11 μ nel diametro massimo e 9 μ nel diametro più piccolo.

*

Colla colorazione di Biondi i vari costituenti nucleari si colorano differentemente e con diversa intensità.

Le anse del filamento nucleinico si colorano in verde smeraldo.

Le granulazioni carioplasmatiche che si rinvengono nei nuclei di queste cellule glandulari come nei nuclei degli altri tessuti di *Spelerpes*, e che per questa ragione si prestano assai come materiale di studio, sono abbondantissime in queste condizioni della cellula e si colorano in rosso, mentre i nucleoli plasmatici si colorano in rosso più vivo (fig. 1).

Il cariospongioplasma, come ho chiamato il sottile reticolo che interseca il nucleo in tutti i sensi e che è evidentissimo in certe condizioni e che sta a rappresentare nel nucleo quello che lo spongioplasma rappresenta nella cellula, non è evidente in questo primo stadio dell'attività cellulare perchè è nascosto dalle numerosissime granulazioni carioplasmatiche che riempiono fittamente il nucleo.

Queste granulazioni carioplasmatiche sono di aspetto rotondo ed omogeneo: sono notevolmente più piccole dei nucleoli plasmatici e si colorano meno intensamente di questi colla fucsina.

Quando in stadi ulteriori dell'attività cellulare, la funzione di secrezione va sempre più progredendo, allora la cellula cambia di forma e di struttura.

La cellula aumenta considerevolmente di volume, diventa conica coll'apice rivolto verso il centro dell'acino.

Lo spongioplasma, in queste condizioni, è più evidente nella parte basale della cellula (fig. 2), mentre la parte cellulare rivolta verso il centro dell'acino è ricca di granulazioni rotonde di aspetto omogeneo, di grandezza varia e colorabili in rosso colla miscela di Biondi (fig. 2).

Di queste granulazioni se ne trovano alcune che hanno una grandezza di poco superiore a quella delle granulazioni carioplasmatiche, altre che hanno le dimensioni del nucleolo plasmatico.

Via via che la secrezione si fa più attiva, è più difficile di ritrovare queste granulazioni piccole mentre invece si trovano

numerose granulazioni più grosse, le quali possono raggiungere le dimensioni fino di 3 μ.

Le granulazioni più grosse si trovano di preferenza alla periferia della cellula, mentre le più piccole si trovano in generale in vicinanza del nucleo (fig. 2).

Quando la secrezione ha raggiunto il massimo di intensità, allora la membrana cellulare si rompe e le granulazioni si riversano al di fuori.

Durante queste fasi del processo di secrezione, anche il nucleo subisce delle modificazioni di forma e di struttura.

Quando la secrezione si compie fisiologicamente: il nucleo si vede aumentare di volume, perde la forma ovolare e si fa più rotondo. Esso può raggiungere un diametro di 13-15 μ.

Contemporaneamente a questo aumento di volume si notano delle modificazioni nel carioplasma.

Le granulazioni carioplasmatiche vanno diminuendo di numero e, quello che è notevole, questa diminuzione delle granulazioni carioplasmatiche coincide con la comparsa nel citoplasma di altre granulazioni che sono uguali o che di poco differiscono da quelle, per forma e reazione verso la sostanza colorante e che al loro primo apparire si trovano aggruppate sul contorno del nucleo e più specialmente da quella parte che guarda il lume glandulare.

Quando la secrezione ha raggiunto il suo massimo di intensità, il nucleo allora è assai povero di granulazioni, mentre il reticolo cariospongioplasmico è molto evidente.

Avvenuta l'eliminazione delle granulazioni che costituiscono il prodotto di secrezione cellulare, il nucleo si riduce di volume e ritorna alle dimensioni primitive.

Conserva però tuttavia un contenuto povero di granulazioni carioplasmatiche, le quali invece vanno in seguito a poco a poco aumentando col ricominciare del ciclo funzionale della cellula.

Quando si pratica un'iniezione di cloridrato di pilocarpina, la secrezione cellulare si compie in modo più rapido e questi fatti si rivelano in modo anche più evidente.

I nuclei raggiungono dimensioni maggiori fino ad acqui-

stare un diametro di 19 e 20 μ: le granulazioni carioplasmatiche scompaiono molto più presto e il reticolo cariospongioplasmico si fa più evidente.

Se la pilocarpina viene somministrata in dosi elevate, allora nel nucleo si determina un disordine funzionale tale che si rivela per modificazioni molto profonde della sua struttura che sono l' espressione di uno stato patologico.

In questi casi il nucleo è aumentato notevolmente (fig. 3, 4) e appare completamente contornato di granulazioni.

Il filamento nucleinico risente di questo disordine della funzione nucleare in modo che le anse vanno colorandosi sempre più pallidamente. Negli stadi più gravi non si ritrova più traccia di esse (fig. 4).

Il reticolo cariospongioplasmico, non più nascosto dalle granulazioni, appare allora in modo evidente.

Il nucleolo plasmatico si conserva inalterato tanto nei casi di secrezione fisiologica, quanto anche dopo somministrazione di alte dosi di pilocarpina.

*
* *

Le modificazioni nucleari che ho sopra descritto dimostrano a sufficienza l' importanza del nucleo nella funzione di secrezione.

Non altrimenti potrebbe essere interpretrato l' aumento di volume del nucleo: aumento che va di pari passo col progredire della attività secretiva della cellula e che raggiunge il suo massimo nel massimo della secrezione per ritornare poi al suo volume normale appena che il prodotto di secrezione cellulare viene eliminato al difuori.

Queste modificazioni morfologiche del nucleo da me riscontrate, confermano pienamente le osservazioni degli autori che ho ricordato al principio di questa nota e che dimostrano come il nucleo non rimanga indifferente nel lavorìo cellulare.

Ma le modificazioni di struttura che presenta il nucleo durante le diverse fasi dell' attività cellulare nelle glandule del veleno dello *Spelerpes*, dimostrano qualche cosa di più importante e risolvono un quesito che finora era rimasto insoluto.

Ho detto infatti come fosse sconoscinto il meccanismo col quale il nucleo prende parte alla funzione di secrezione.

In queste osservazioni è resultato in modo evidente che, coll' aumentare di volume, il nucleo perde un certo numero di granulazioni carioplasmatiche, le quali si fanno anche più rare nell' ultima fase della secrezione.

Questa modificazione del nucleo rispetto al suo contenuto permane qualche tempo dopo che la secrezione è compiuta e che il prodotto di secrezione è stato riversato al di fuori.

Solamente dopo un po' di tempo nel nucleo ricominciano ad aumentare le granulazioni carioplasmatiche fino a riempire di nuovo tutti gli spazi liberi del carioplasma.

Il fatto notevole che la scomparsa delle granulazioni carioplasmatiche coincide colla comparsa nel citoplasma, subito al difuori del nucleo, di granulazioni uguali a quelle per forma e per reazione verso le sostanze coloranti e il fatto che tanto più scarse sono le granulazioni nucleari, tanto più numerose si presentano quelle del citoplasma mi pare provi a sufficienza che le granulazioni del citoplasma, devono ritenersi di origine nucleare e che quindi il nucleo partecipa all' attività secretiva dell' organismo cellulare somministrando al citoplasma delle sostanze che hanno già subìto una elaborazione endonucleare.

Questo è anche confermato dal fatto che durante il periodo di riformazione delle granulazioni carioplasmatiche, in quel periodo cioè che segue immediatamente alla eliminazione dei prodotti di secrezione cellulare, non compaiono nel citoplasma granulazioni, mentre queste ricominciano a comparire quando il nucleo si è già arricchito di granulazioni carioplasmatiche.

Le granulazioni che compaiono nel citoplasma e che hanno da prima le stesse dimensioni di quelle nucleari, vanno man mano aumentando di volume fino a raggiungere delle dimensioni assai notevoli.

La colorazione colla miscela di Biondi mentre presenta dei reali vantaggi per studiare le modificazioni strutturali del nucleo, non permette di stabilire le differenze di natura chimica che passano fra le granulazioni piccole che si trovano di preferenza in corrispondenza del contorno nucleare e le granula-

zioni più grandi che si trovano invece verso le parete della cellula che guarda il lume dell' acino glandulare.

Certo è che il loro aumento considerevole di volume dimostra che queste granulazioni di origine carioplasmatica devono aver subìto dei cambiamenti notevoli nel citoplasma.

Con altri metodi sarà possibile distinguere queste differenze.

A me oggi basta di confermare con queste osservazioni un fatto che ho constatato in altre mie ricerche fino dal principio del 1894 e che cioè : *il nucleo cellulare partecipa alla funzione di secrezione somministrando al citoplasma dei materiali che hanno già subìto una elaborazione endonucleare e che, modificati nel citoplasma stesso, sono destinati a divenire prodotti di secrezione.*

BIBLIOGRAFIA

1. Carnoy J. B., La biologie cellulaire. — Étude comparée de la cellule dans les deux règnes. 1884.
2. Demoor J., Contribution à l'étude de la physiologie de la cellule (indépendence fonctionnelle du protoplasma et du noyau). (Archives de Biologie, tomo XIII, fasc. 2°, 1894.)
3. Eimer, Die Entstehung der Arten auf Grund von Vererben erworbenen Eigenschaften nach den Gesetzen organischen Wachsens. Jena, 1888.
4. Haberlandt, Ueber die Beziehungen zwischen Iniection und Lage des Zellkerns bei den Pflanzen. Jena, 1887.
5. Helm F. E., Ueber die Spinndrüsen der Lepidopteren. (Zeitschr. f. wiss. Zool., Bd. 26, 1876.)
6. Hertwig O., Beiträge zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung u. Theilung des thierischen Eies. (Morphol. Jahrb., Bd. I, 1876 u. Bd. III, 1877.)
7. Hofer, Exp. unters. über den Einfluss des Kerns auf das Protoplasma. (Jena Zeitschr, f. Naturwissensch., Bd. XXIV.)
8. Korschelt E., Beiträge zur Morphologie und Physiologie des Zellkernes. (Zool. Jahrb. Abtheil. f. Anat. u. Ontogenie der Thiere, Bd. IV, 1889.)
9. Leydig F., Lehrbuch der Histologie des Menschen und der Thiere. Frankfurt, 1857.
10. Meckel H., Mikrographie der Drüsenapparate einiger niederer Thiere. (Arch. f. Anat. u. Phys., 1846.)
11. Verworn, Die physiologische Bedeutung des Zellkerns. (Pflüger's Arch. Bd. 51, 1889.)
— Die Bewegung der lebendigen Substanz. Jena, 1892.
12. Zaddach G., Untersuchungen über die Entwickelung und den Bau der Gliederthiere. (Die Entwickelung des Phryganideneies. Berlin, 1854.)

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

I disegni furono fatti da preparati coloriti colla miscela di Biondi e osservati con un microscopio Reicherts. Ob. $^1/_{12}$ imm. omog. semiapocromatico e Oc. 3.

Figura 1. — Cellula glandulare al principio della secrezione. — Nucleo di dimensioni normali con numerose granulazioni carioplasmatiche.

Figura 2. — Cellula glandulare nel massimo della sua attività di secrezione allo stato fisiologico. — Nucleo aumentato di volume e con scarse granulazioni carioplasmatiche.

Figura 3, 4. — Cellule glandulari dopo la somministrazione del cloridrato di pilocarpina. — Nuclei considerevolmente aumentati di volume. Nel carioplasma non si scorge più traccia di granulazioni. Il filamento nucleinico (Fig. 4) è scomparso.

Estratto dallo Sperimentale, anno XLIX (*Sezione Biologica*, fasc. II).

Stab. Tip. Fiorentino, Via S. Gallo, 33, Firenze. – 1895.

A. Trambusti dis. ed inc.

Firenze, Lit. dei Ricordi di Architettura, Piazza S. Croce 20